

REAKTION
VON TRIS(2-CHLORÄTHYL)AMIN
MIT GLYKOPHORIN A
DER MENSCHLICHEN
ERYHTROZYTENMEMBRAN
IN VITRO

Martin Schorsch

Diss
München
1985



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554828_0007

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität München

Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Forth

REAKTION VON TRIS(2-CHLORÄTHYL)AMIN MIT
GLYKOPHORIN A DER MENSCHLICHEN ERYTHRO-
ZYTENMEMBRAN IN VITRO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von

Martin Schorsch

aus

Aachen

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Forth

Dekan: Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Januar 1985

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>Seite</u>
A. Einleitung	1
A.1 Glykophorin A	4
B. Problemstellung	6
C. Experimenteller Teil	8
C.1 Inkubation menschlicher Erythrozyten mit HN-3	8
C.1.1 Isolierung der Erythrozytenmembranen	8
C.2 Reaktion von ^{14}C -HN-3 mit menschlichen Erythrozyten	9
C.3 Isolierung der Glykophorine mit der LIS/Phenolmethode	9
C.4 Reinigung der Glykophorine über eine Phosphocellulosesäule	10
C.5 Auftrennung der Glykophorine	11
C.6 SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese	11
C.7 Autoradiographie der getrockneten Gele	13
C.8 Bestimmung der Radioaktivität in den Gelen	13
C.9 Proteinbestimmung	14
C.10 Tryptische Spaltung von Glykophorin A	14
C.11 Zweidimensionale Auftrennung der wasserlöslichen Peptide von Glykophorin A	15
C.12 Neuraminidase-Behandlung von Erythrozyten nach Inkubation mit ^{14}C -HN-3	16
C.13 Trypsin-Behandlung von Erythrozyten nach Inkubation mit ^{14}C -HN-3	16
C.14 Hitze-Dissoziation von Glykophorin A nach Inkubation von Erythrozyten mit verschiedenen HN-3 Konzentrationen	17
D. Ergebnisse	19
D.1 Reaktion von ^{14}C -HN-3 mit menschlichen Erythrozytenmembranen in vitro	19
D.2 Abtrennung der Glykophorine	20

D.3	Abtrennung von Glykophorin A	22
D.4	Nachweis der Bindung von ^{14}C -HN-3 an Glykophorin A	24
D.5	Quantitative Bestimmung der Bindung von ^{14}C -HN-3 an Glykophorin A	26
D.6	Tryptische Spaltung von isoliertem Glykophorin A nach Inkubation der Erythrozyten mit ^{14}C -HN-3	27
D.7	Zweidimensionale Auftrennung und Autoradiographie der wasserlöslichen tryptischen Spaltprodukte von Glykophorin A	29
D.8	Reaktion von ^{14}C -HN-3 mit dem Peptid T1 von Glykophorin A	30
D.9	Reaktion von ^{14}C -HN-3 mit den Kohlhydraten von Glykophorin A	33
D.10	Hitze-Dissoziation von Glykophorin A nach Inkubation intakter menschlicher Erythrozyten mit HN-3	34
	Zusammenfassung	43
E.	Diskussion	45
F.	Geräte und Materialien	48
F.1	Geräte	48
F.2	Materialien	49
	Literaturverzeichnis	50

A Einleitung

Biologische Membranen ermöglichen der Zelle, eine Vielzahl von Stoffwechselvorgängen getrennt voneinander ablaufen zu lassen. Sie begrenzen das Cytosol und unterteilen die Zelle in morphologisch erfassbare Funktionsräume.

Nach der Modellvorstellung des "Fluid Mosaik" von SINGER und NICHOLSON (18) lagern sich Phospholipide, Cholesterin etc. mit den hydrophoben Anteilen so zusammen, daß ein bimolekularer Film von 50 bis 100 Å Dicke entsteht.

Dieser Matrix aufgelagert sind periphere Proteine, wobei die Fluidität der Matrix ihnen eine Beweglichkeit in der Membran ermöglicht.

Vollständig durchquert wird die Membran von integralen Proteinen, von denen einige an Transportprozessen beteiligt sind. Auf diese Weise wird ein Stofftransport von hydrophilen Verbindungen ermöglicht, für die die Membran im Sinne einer osmotischen Barriere weitgehend impermeabel ist.

Je nach Art und Aufbau der Zelle treten Unterschiede im Aufbau und der Struktur der verschiedenen Membranen auf. Im folgenden Beispiel soll der Aufbau der wohl am besten untersuchten Membran - der Erythrozytenmembran - beschrieben werden.

Trennt man die Proteine der Erythrozytenmembran mit der Methode der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht auf, so erhält man nach der Anfärbung mit Comassie-Blau mehrere Banden, die nach der Nomenklatur von STECK (20) mit Ziffern bezeichnet werden.

Färbt man die Proteine mit Schiff's Reagenz (26) an, so werden bis zu vier Banden sichtbar, die nach der Methode der Färbung (Perjodic Acid Staining) mit PAS I, PAS II, PAS III und PAS IV bezeichnet werden (20). Diese PAS-Banden repräsentieren Glykoproteine der menschlichen Erythrozytenmembran (Abb. 1).

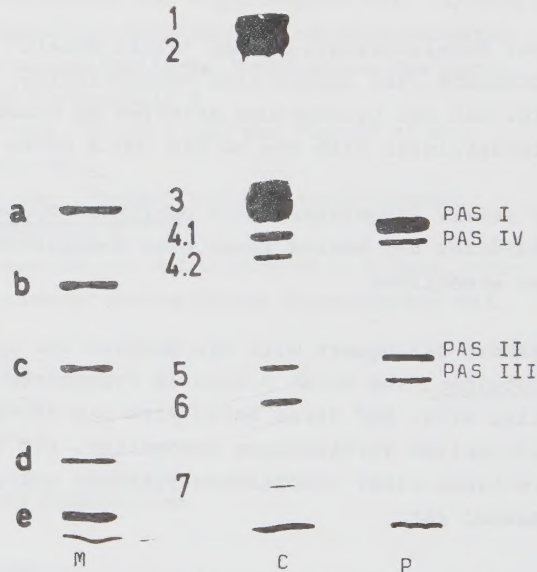


Abb. 1: Auftrennung der Proteine der menschlichen Erythrozytenmembran mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese - (Gradientengel PA 5-12 %) Exp. Teil C.6.

M = Marker: a) β -Galactosidase MG 116000
 b) Phosphorylase b MG 92000
 c) Rinderserum Albumin MG 66000
 d) Ovalbumin MG 45000
 e) Carboanhydratase MG 31000

C = Comassie-Blau-Färbung der Proteine

P = Perjodic Acid Staining der Glykoproteine mit Schiff's Reagenz, Numerierung nach STECK (20)

Die Beschriftung der Proteinbanden erfolgte nach STECK (20). Die Zahlen entsprechen denjenigen in Abbildung 1.

A.1 Glykophorin A

Die Glykoproteine der menschlichen Erythrozytenmembran waren in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Untersuchungen (12, 19, 23).

1971 berichtete MARCHESI und ANDREWS (10) über die Isolierung eines wasserlöslichen Glykoproteins aus der Erythrozytenmembran, das sie Glykophorin A nannten. 75 % aller Glykoproteine der Erythrozytenmembran ist Glykophorin A. Sein Anteil am Gesamtgewicht der Membranproteine beträgt 1,5 % (7).

An gereinigtem Glykophorin A konnten die Blutgruppeneigenschaften M und N nachgewiesen werden. Weiterhin wurden Rezeptoreigenschaften für die Bindung von Influenza Viren und Phytohämagglutinin nachgewiesen (11).

Die Bestimmung der Aminosäuresequenz ergab eine Primärstruktur von 131 Aminosäuren. Das N-terminale Ende, das sich an der Außenseite des Erythrozyten befindet, ist glykosiliert. Dieser Zuckeranteil beträgt 60 % des Molekulargewichtes und ist wahrscheinlich verantwortlich sowohl für die Blutgruppeneigenschaften als auch für die Rezeptoreigenschaften (11).

In der Peptidkette, die 40 % des Molekulargewichtes ausmacht, gibt es einen Bezirk, in dem die hydrophoben Aminosäuren überwiegen. Dieser Bereich stellt den in der Membran befindlichen (integralen Anteil) des Moleküls dar (6).

Untersuchungen zur Tertiärstruktur ergaben einen Anteil von 10 % Faltblattstruktur (β -Form) und 27 % Helix (17).

Die Anordnung von Glykophorin A in der Membran ist bisher nicht eindeutig geklärt. So glauben FURTHMAYR und MARCHESI (6) aufgrund ihrer Untersuchungen über die Hitze-Dissoziation von Glykophorin A nachweisen zu können, daß es sich bei PAS I um die dimere Form und bei PAS II um die monomere Form von Glykophorin A handelt. In der Membran soll die dimere Form durch den integralen Anteil stabilisiert werden.

Abbildung 3 zeigt diese Modellvorstellung.

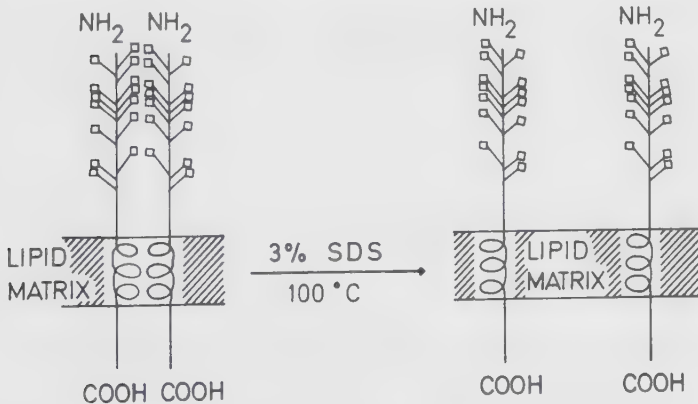


Abb. 3: Modell der Anordnung von Glykophorin A in der Erythrozytenmembran - die dimere Form kann nach FURTHMAYR (6) mit 3 % SDS und Erhitzen auf 100 °C in die monomere Form übergeführt werden.

Zu entgegengesetzten Ergebnissen gelangten MUELLER et al. aufgrund ihrer Versuche, die Glykoproteine mit Laktoperoxidase-Iodierung zu markieren (14). Ihren Ergebnissen nach handelt es sich bei PAS I und PAS II um verschiedene Glykoproteine.

B. Problemstellung

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit waren die Untersuchungen von WILDENAUER und WEGER (25) über die Reaktion des Alkylans Tris(2-chloräthyl)amin (HN-3) mit den Membranproteinen der menschlichen Erythrozyten.

Sie fanden dabei eine ausgeprägte Quervernetzung (Cross-Linking) des Membranstrukturproteins "Spektrin". Weiterhin erhielten sie Hinweise auf mögliche Reaktionen mit anderen Membranproteinen, unter anderem auch mit dem Glykophorin A.

1. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob HN-3 mit Glykophorin A reagiert und ob es bevorzugte Reaktionsstellen am Glykophorin A für das Alkylans gibt. Dazu sollte:
 - a) Glykophorin A aus mit ^{14}C -HN-3 inkubierten Erythrozyten isoliert und
 - b) mit proteinchemischen Methoden die Verteilung von ^{14}C -HN-3 am Glykophorin A Molekül untersucht werden.
2. Beobachtungen von MORTON und GARVIN (13) sowie von FURTHMAYR und MARCHESI (6) zeigten, daß nach Erhitzen von isolierten Erythrozytenmembranen in Gegenwart von 3 % SDS die Intensität der Bande PAS I abnimmt und die der Bande PAS II zunimmt (Hitze-Dissoziation; Abb. 3). Sie folgerten daraus, daß es sich bei PAS I um die dimere Form und bei PAS II um die monomere Form von Glykophorin A handelt.

Nachdem die Reaktion von HN-3 mit Glykophorin A nachgewiesen werden konnte, sollte untersucht werden, ob

sich die Reaktion von HN-3 mit dem Molekül dazu verwenden läßt, eine Aussage über die Anordnung von Glykophorin A zu machen und festzustellen, ob Glykophorin A in der dimeren oder monomeren Form in der Erythrozytenmembran vorliegt.

Durch Verwendung des quervernetzenden Alkylans sollte es möglich sein, die Untereinheiten der dimeren Form kovalent so miteinander zu verbinden, daß eine Aufspaltung durch Hitze-Dissoziation nicht mehr möglich ist.

C. Experimenteller Teil

C.1 Inkubation menschlicher Erythrozyten mit HN-3

Blut aus einer Blutkonserve wurde 5 Minuten bei 4 °C mit 5000 g x max zentrifugiert. Nach Entfernen des Leukozytenüberstandes und des Plasmas wurden die Erythrozyten dreimal mit einem Phosphatpuffer und einmal mit dem Inkubationspuffer gewaschen (Zusammensetzung der Puffer s.u.). Nach dem Einstellen des jeweils benötigten Hämatokrit mit Inkubationspuffer wurden die Erythrozyten 30 Minuten mit verschiedenen HN-3-Konzentrationen bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion wurden die Erythrozyten abzentrifugiert und dreimal mit eiskaltem Inkubationspuffer gewaschen.

C.1.1 Isolierung der Erythrozytenmembranen

Die Erythrozytenmembranen wurden bei allen Versuchen nach dem Verfahren von STECK und KANT (20) durch hypotone Hämolyse präpariert. Dazu wurden die gewaschenen Erythrozyten (C.1) mit dem 40fachen Volumen eines eiskalten 5mM Phosphatpuffers pH8 (5P8) versetzt. Die Membranen wurden bei 22000 g x max bei 4 °C abzentrifugiert und dreimal mit 5P8 gewaschen.

Zusammensetzung der Puffer:

Phosphatpuffer:	150 mM NaCl 5 mM Phosphat pH 8,0
Inkubationspuffer:	100 mM Tris-HCl; 0,37 % NaCl pH 7,0
5P8:	5 mM Phosphat pH 8,0

C.2 Reaktion von ^{14}C -HN-3 mit menschlichen Erythrozyten

750 ml Blut aus einer Blutkonserve wurden wie unter C.1 beschrieben gewaschen und nach dem Waschen der Erythrozyten mit Inkubationspuffer auf einen Hkt von 50 Vol.% eingestellt.

Im Anschluß daran wurde die Erythrozytensuspension 30 Minuten bei 37 °C mit 2,0 mM ^{14}C -HN-3 in einem Wasserbad inkubiert.

Die spezifische Aktivität von ^{14}C -HN-3 betrug 1,7 mCi/mmol.

Um die Bindung von ^{14}C -HN-3 an die Erythrozytenmembran berechnen zu können, wurde vom Inkubationsansatz, vom Hämolysat, vom Waschwasser und von den präparierten Membranen ein Aliquot abgenommen, und nach entsprechender Aufbereitung der Proben (C.8) die ^{14}C -Radioaktivität in einem Szintillationszähler gemessen.

C.3 Isolierung der Glykophorine mit der LIS/Phenol-methode

Die Isolierung der Glykophorine aus unbehandelten oder mit HN-3 behandelten Erythrozyten erfolgte nach der LIS/Phenol-Methode von MARCHESI und ANDREWS (10).

Dazu wurden die Membranen nach der Präparation (C.1) gefriergetrocknet (lyophilisiert). Nach der Proteinbestimmung (9) wurde das Lyophilisat mit 50 mmol Tris-HCl-Puffer pH 7,5 auf eine Proteinkonzentration von 25 mg/ml eingestellt. Dann wurde zu dieser Lösung Lithium - Diiodosalicylat (LIS) gegeben, bis eine Konzentration von 0,3 M erreicht war. Die Lösung wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe

des doppelten Volumens Wasser wurde 10 Minuten bei 4 °C gerührt. Im Anschluß daran wurde diese Lösung 90 Minuten mit 45000 g x max bei 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit dem gleichen Volumen einer frisch bereiteten 50 %igen Phenollösung versetzt und 15 Minuten bei 4 °C gerührt. Die Abtrennung der Phenollösung erfolgte durch Zentrifugieren bei 4000 g x max bei 4 °C. Es bildeten sich hierbei zwei Phasen, wobei die obere klare Phase den größten Teil der Glykophorine enthielt (10).

Um das restlichen Phenol abzutrennen, wurde die klare Phase 36 Stunden gegen Wasser dialysiert, wobei das Wasser dreimal gewechselt wurde.

Das dialysierte Material wurde gefriergetrocknet, anschließend in absoluten Äther suspendiert und 6 Stunden bei 4 °C gerührt. Die Suspension wurde bei 5000 g x max zentrifugiert, das Pellet in Wasser gelöst und bei 10000 g x max zentrifugiert.

Der klare Überstand enthielt die Glykophorine.

Dieser Überstand wurde gefriergetrocknet.

C.4 Reinigung der Glykophorine über eine Phosphocellulosesäule

Um eventuell noch verunreinigende andere Membranproteine von den Glykophorinen zu trennen, wurde das Lyophilisat (C.3) in jeweils 3 ml einer bei 4 °C gesättigten wässrigen Citronensäure-Lösung pH 3,5 gelöst und die Lösung auf eine Phosphocellulose-Säule P11 aufgetragen. Die Maße der Säule betrugen: Länge 30 cm, Durchmesser 2,0 cm. Beschickt war die Säule mit Phosphocellulose P11, die mit Na-Citrat 0,02 M pH 3,6 äquilibriert war.

Die Glykophorine binden im Gegensatz zu den anderen Membranproteinen nicht an die Cellulose und erschienen mit der Front als gemeinsamer Peak. Die die Glykophorine enthaltenen Fraktionen wurden gesammelt und nach Bestimmung der Radioaktivität gefriergetrocknet.

C.5 Auftrennung der Glykophorine

Die Auftrennung der Glykophorine erfolgte nach der Vorschrift von TOMITA et al. (22). Dazu wurde das Lyophilisat (C.4) in 3 ml Puffer mit folgender Zusammensetzung gelöst:

0,1 % Ammonyx-LO, 25 mM NaCl, 5 mM Phosphat pH 8,0

Die Lösung wurde auf eine Agarose-Säule (Biorad A 0,5 mm), die mit dem gleichen Puffer äquilibriert war, aufgetragen.

Maße der Säule: Länge 90 cm, Durchmesser 1,5 cm.

Nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen (9) und der ^{14}C -Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen wurden die Fraktionen, die das Glykophorin A enthielten (11), gesammelt und lyophilisiert.

C.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

- Aufbereitung der Proben

2 mg des Lyophilisats von C.5 wurden in 1 ml Wasser gelöst und mit 1 ml Puffer, der folgende Zusammensetzung hatte (0,0625 M Tris-Hcl pH 6,8; 2 % SDS; 10 % Glycerol; 5 % β -Mercaptoäthanol und als Frontmarker Bromphenol-Blau), 2 Minuten auf dem Wasserbad gekocht und anschließend zentrifugiert.

- Herstellung der Gele

Die Gele wurden nach der Vorschrift von LAEMMLI (8) angefertigt. Die Polyacrylamid-Konzentration im Trenngel betrug 10 % oder 20 %. Bei den Gradientengelen wurde ein Gradient von 5 % bis 12 % hergestellt. Dazu wurden 10 % (20 %, 5 % und 12 %) Polyacrylamid aus einer Stammlösung entnommen, die 0,8 % N, N-Bis-methylenacrylamid; 0,375 M Tris-HCl pH 8,8; 0,1 % SDS enthielt. Es wurden 0,025 % Tetramethyläthylendiamin (Temed) zugesetzt und die Polymerisation mit Ammoniumpersulfat (0,025 %) gestartet.

- Elektrophoresepuffer

0,025 M Tris-HCl; 0,192 M Glycin pH 8,3; 0,1 % SDS
Zur Durchführung der Elektrophorese wurde eine Apparatur nach STUDIER (21) verwendet, mit einer Gleichstromquelle 35 mA 4 Stunden bei 4 °C.

- Fixierung

Die Gele wurden 30 Minuten in einer wässrigen Lösung von 12,5 % Trichloressigsäure fixiert.

- Färbung der Glykoproteine nach der PAS-Technik (26)

Dazu wurden die Gele nach dem Fixieren 3 Stunden mit Wasser gewaschen und anschließend 50 Minuten in eine Lösung von 1 % Perjodsäure und 3 % Essigsäure gelegt. Überschüssige Perjodsäure wurde durch Waschen der Gele (12 Stunden in Wasser) entfernt. Anschließend wurden die Gele 50 Minuten mit Schiff's Reagenz versetzt. Zum Entfärben wurden diese Gele 3 x 10 Minuten in frisch

bereitete Natriumdisulfidlösung (0,5 %) gelegt und anschließend mit Wasser gewaschen.

- Färben der Membranproteine mit Comassie-Blau

Die Färbelösung enthielt 0,01 % "Comassie-Blau", 25 % Methanol und 10 % Essigsäure (30 Minuten). Zum Entfärben wurden die Gele mit einer wässrigen Lösung von 5 % Methanol und 7 % Essigsäure behandelt.

- Trocknen der Gele

Die Gele wurden auf Filterpapier in eine große Nutsche gelegt, mit einer weichen Gummifolie abgedeckt und nach Anlegen eines Vakuums durch Heißluftzufuhr getrocknet.

C.7 Autoradiographie der getrockneten Gele

Die getrockneten Gele wurden mit einem Röntgen-Film (Medical X-Ray Film RP/R 54) zwischen zwei und vier Wochen exponiert.

C.8 Bestimmung der Radioaktivität in den Gelen

Die einzelnen Bahnen wurden waagrecht zur Laufrichtung in 3 mm breite Streifen geschnitten und in 3 % Protosol/Econofluor 24 Stunden bei 37 °C solubilisiert. Anschließend wurde zu jeder Probe 50 µl Es-

sigsäure gegeben und die Radioaktivität in einem Szintillationszähler bestimmt.

C.9 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach einer modifizierten Methode nach LOWRY (9).

C.10 Tryptische Spaltung von Glykophorin A (22)

Das lyophilisierte Glykophorin A wurde mit 50 mM Tris-HCL-Puffer pH 8,5 auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml eingestellt und mit Trypsin 18 Stunden bei 37 °C inkubiert. Das Verhältnis Enzym/Substrat betrug 1/30. Nach der Inkubation wurde die Reaktion mit dem 10fachen Überschuß Trypsin-Inhibitor gestoppt und die klare Lösung mit Essigsäure auf ein pH von 4,0 eingestellt.

Nach dem Zentrifugieren bei 3000 rpm (Laborfuge/Beckmann) wurde der klare Überstand, der die wasserlöslichen Peptide enthielt, vorsichtig abdekantiert und eingefroren.

Um das Pellet, das den integralen Anteil (T6) des Moleküls repräsentierte von noch verunreinigenden wasserlöslichen Peptiden zu trennen, wurde es in Wasser suspendiert und mit Amoniumhydroxid auf ein pH von 7,5 gebracht. Dabei ging das hydrophobe Peptid wieder in Lösung. Ausgefällt wurde es durch Ansäuren der Lösung mit Essigsäure bis pH 4,0. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt. Anschließend wurde das Peptid in Protosol/Econofluor gelöst und die Radioaktivität in einem Szintillationszähler bestimmt.

C.11 Zweidimensionale Auftrennung der wasserlöslichen Peptide von Glykophorin A

Die wasserlöslichen Peptide der tryptischen Spaltung (C.10) wurden nach dem Verfahren von CHEN (3) aufgetrennt.

Dazu wurden 10 µl der wässrigen Peptid-Lösung auf eine Dünnschicht-Chromatographie-Platte (CEL 300; 0,1 mm mikrokristalline Cellulose) aufgetragen. Anschließend wurde eine Elektrophorese mit 500 V-Gleichstrom unter guter Kühlung der Platte 105 Minuten durchgeführt.

- Zusammensetzung des Elektrophorese-Puffers

Pyridin : Essigsäure : Aceton : Wasser =

1 : " : 8 : 40 pH 4,4

Nach der Elektrophorese erfolgte die Auftrennung in der zweiten Dimension durch Chromatographie.

- Zusammensetzung des Laufmittels

Pyridin : n-Butanol : Essigsäure : Wasser =

50 : 75 : 15 : 60

Im Anschluß daran wurden die Platten getrocknet, mit 3 % Ninhydrin besprüht und im Trockenschrank bei 95 °C entwickelt.

Zur Autoradiographie (C.7) wurden die Platten für 4 Wochen mit einem Röntgenfilm exponiert.

C.12 Neuraminidase-Behandlung von Erythrozyten nach
Inkubation mit ^{14}C -HN-3

Erythrozyten wurden wie unter C.1 beschrieben behandelt. Um die Kohlehydrate von der Erythrozytenmembran abzutrennen, wurde nach der Methode von FURTHMAYR (6) verfahren. Dazu wurden 1,0 ml Erythrozytensuspension (HKt 50 Vol.%) mit 1,0 ml Inkubationspuffer (s.u.) und 0,5 U Neuraminidase 3 Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Erythrozyten mit 5000 g x max abzentrifugiert. Die Erythrozyten wurden entfernt und der Überstand erneut bei 22000 g x max zentrifugiert. Der verbleibende klare Überstand mit den Kohlehydraten der Erythrozytenmembranoberfläche wurde gefriergetrocknet und für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese verwendet.

- Zusammensetzung des Inkubationspuffers:

50 mmol Na-Acetat; 0,2 mmol EDTA; 2,0 mmol Calciumchlorid, pH 4.5.

C.13 Trypsin-Behandlung von Erythrozyten nach Inkuba-
tion mit ^{14}C -HN-3

Um den an der Außenseite der Membran gelegenen peripheren Anteil von Glykophorin A abzuspalten, wurden Erythrozyten wie unter C.1 beschrieben behandelt und nach Reaktion mit 2,0 mmol ^{14}C -HN-3 mit Trypsin inkubiert (C.1.1).

Dazu wurden 1,0 ml Erythrozytensuspension (HKt 50 Vol.%) mit 0,4 mg Trypsin in 2,0 ml Phosphatpuffer

(C.1.1) pH 8,0 eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2,0 mg Trypsininhibitor gestoppt. Die weitere Abtrennung des Überstandes, der den an der Außenseite der Membran gelegenen Anteil von Glykophorin A enthielt, erfolgte wie unter C.12 beschrieben.

C.14 Hitze-Dissoziation von Glykophorin A nach Inkubation von Erythrozyten mit verschiedenen HN-3 Konzentrationen

Erythrozyten wurden wie unter C.1 beschrieben gewaschen und mit Inkubationspuffer (C.1.1) auf einen HKt von 10 Vol.% eingestellt.

Jeweils 1,0 ml dieser Erythrozytensuspension wurden mit 0,5 mmol; 1,0 mmol; 2,0 mmol HN-3 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Präparation der Membranen (C.1.1) wurden diese mit Inkubationspuffer auf einen Proteingehalt von 3,0 mg/ml eingestellt. Von dieser Membransuspension wurden jeweils 150 µl abgenommen, mit 150 µl Puffer (FURTHMAYR (6)) versetzt und eine halbe Stunde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Von den Proben wurden jeweils 50 µl zur Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet (10 % p.a.). Der verbleibende Rest wurde 3 Minuten auf 100 °C erhitzt. Dann wurden erneut jeweils 50 µl zur Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese abgenommen.

Nach Durchführung der Elektrophoresen und Anfärbung der Glykophorine (C.6) wurde die Farbtintensität der einzelnen Banden bei 546 nm bestimmt.

- Zusammensetzung des Puffers nach FURTHMAYR (6)
6 % SDS; 4 M Harnstoff, 20 mM Tris-HCl pH 6,8;
2,0 mM EDTA; 3 % β -Mercatoäthanol (30 μ g Bromphenol-
blau/ml als Frontmarker).

D. Ergebnisse

D.1 Reaktion von ^{14}C -HN-3 mit menschlichen Erythrozytenmembranen in vitro

WILDENAUER und WEGER (25) untersuchten die Bindung von HN-3 an menschliche Erythrozyten in vitro.

Sie fanden kovalente Reaktionen mit den Proteinen der Erythrozytenmembran und mit dem Hämoglobin. Als Untersuchungsverfahren diente die SDS-PA-Gelelektrophorese. Bei der Reaktion mit den Membranproteinen war die Reaktion von HN-3 mit dem Membranprotein "Spektrin" vorherrschend. Die Untereinheiten dieses Strukturproteins wurden durch HN-3 kovalent so miteinander verknüpft, daß sie an der Auftragstelle des Gels verblieben und nicht mehr an die charakteristische Stelle im Gel wanderten.

Die Verwendung von ^{14}C -HN-3 und Autoradiographie der Gele ergab jedoch auch den Hinweis, daß ^{14}C -HN-3 neben der Reaktion mit dem Membranprotein "Spektrin" auch mit dem Glykophorin A, ebenfalls ein Membranprotein, reagiert.

Um die Bindung von ^{14}C -HN-3 an die Erythrozytenmembran zu ermitteln, wurden in der vorliegenden Arbeit Erythrozyten mit 2,0 mmol ^{14}C -HN-3 inkubiert und weiterbehandelt, wie unter C.1.1 beschrieben.

Wie Abbildung 4 zeigt, wurden bei einer Konzentration von 2,0 mmol ^{14}C -HN-3, 3,5 % an die Membran gebunden.

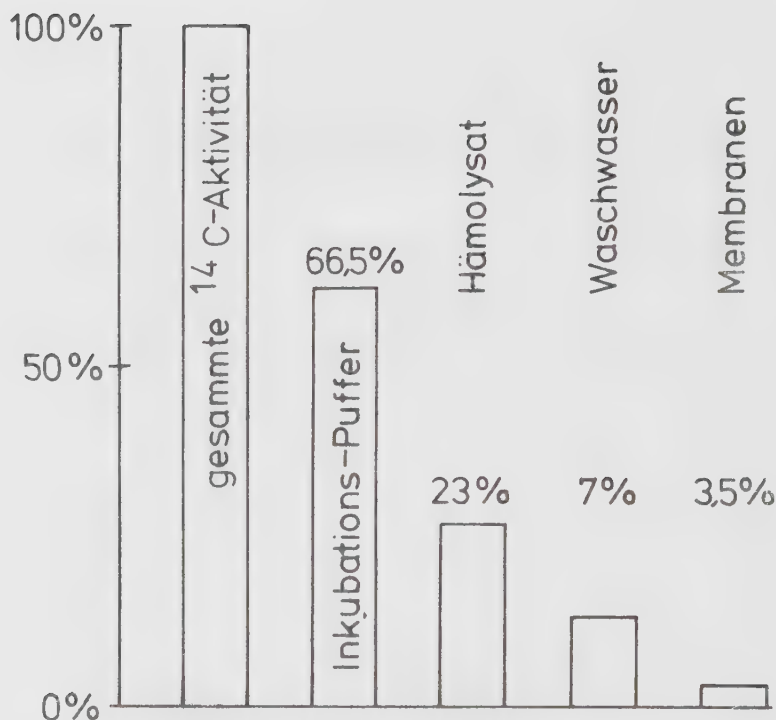


Abb. 4: Verteilung von ^{14}C -HN-3 nach der Inkubation mit menschlichen Erythrozyten (exp. Teil C.1; C.2)

D.2 Abtrennung der Glykophorine

Um die Glykophorine von den anderen Membranproteinen abzutrennen, wurde die LIS/Phenol-Methode von MARCHESI und ANDREWS (11) verwendet.

Lithium-Dijodosalicylat (LIS) desintegriert als sogenanntes "chaotropes Agens" die Membran und löst damit die Glykophorine aus der Membran. Dieser Vorgang ist von der LIS-Konzentration abhängig und hat ein Optimum bei 0,3 Mol LIS. Im Gegensatz zu anderen Detergentien wie z.B. Triton ist es möglich, LIS nach der Pro-

teinisolierung schnell und vollständig durch Dialyse zu entfernen.

Die Abtrennung der Glykophorine von den anderen Membranproteinen erfolgte nach der LIS-Behandlung mit einer 50 %igen Phenol-Lösung (exp. Teil C.3).

Anschließend wurden sie über eine Phosphocellulose-Säule chromatographiert (exp. Teil C.4).

Da die Glykophorine - im Gegensatz zu den anderen Membranproteinen - nicht an die Phosphocellulose binden, wurden sie mit der Front des Laufmittels isoliert.

In den einzelnen Fraktionen wurde die Proteinkonzentration und die ^{14}C -Radioaktivität bestimmt (Abb. 5).

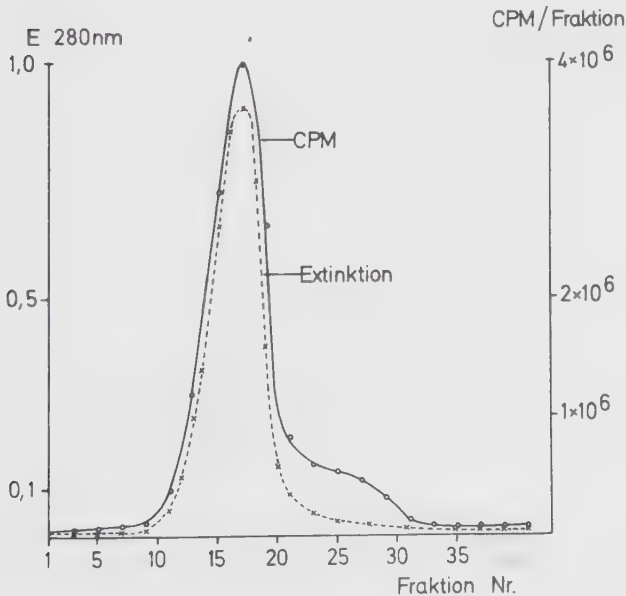


Abb. 5: Abtrennung der Glykophorine mit der LIS/Phenol-methode nach MARCHESI und ANDREWS (11)

Der Nachweis der Proteine erfolgte durch Bestimmung der Extinktion bei 280 nm.

Zur Bestimmung der Radioaktivität wurde von den einzelnen Fraktionen jeweils ein Aliquot abgenommen und die Radioaktivität bestimmt.

D.3 Abtrennung von Glykophorin A

Um Glykophorin A von den anderen Glykoproteinen abzutrennen, wurde nach der Methode von FURTHMAYR et al. (7) verfahren. Hierbei wurden die Glykoproteine durch Gel-Filtration in Gegenwart des Detergens Ammonyx-LO aufgetrennt (Abb. 6).

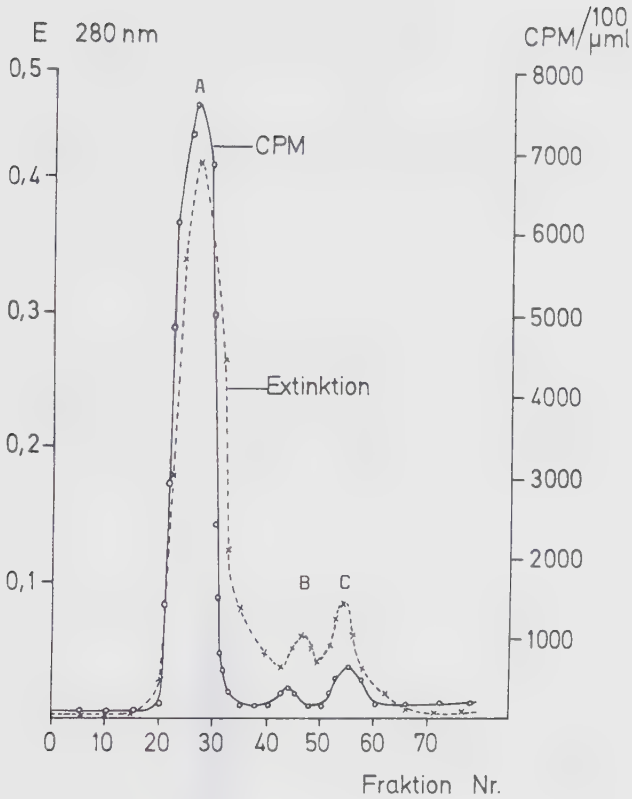


Abb. 6: Auftrennung der Glykophorine (Agarose 0,5 mm)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration und der ^{14}C -Radioaktivität erfolgte wie bei D.2 (exp. Teil C.5).

—————: ^{14}C -Radioaktivität (CPM/ μl)

-----: Proteinkonzentration (E = 280 nm)

Es traten drei Peaks auf, wobei es sich (FURTHMAYR (7)) bei Peak A um die dimere Form entsprechend PAS I, bei Peak B um die monomere Form entsprechend PAS II und bei Peak C um eine Fraktion handelt, die sowohl die in der SDS-PA-Gelelektrophorese mit PAS I als auch die mit PAS III bezeichnete Bande enthält.

Die Bestimmung der ^{14}C -Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen ergab einen Hinweis für die Reaktion von ^{14}C -HN-3 mit Glykophorin A.

D.4 Nachweis der Bindung von ^{14}C -HN-3 an Glykophorin A

Die Fraktionen von Peak A wurden gesammelt, gegen Wasser dialysiert und gefriergetrocknet. Vom Lyophilisat wurden SDS-PA-Gelelektrophorese und nach Trocknen des Gels Autoradiographien durchgeführt (Abb. 7).

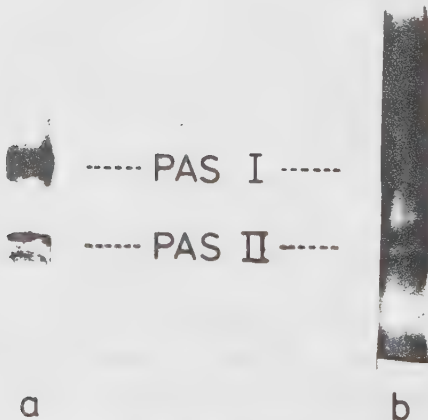


Abb. 7: a) SDS-Pa-Gelelektrophorese nach Anfärbung mit Schiff's Reagenz (10 % Akrylamid)
b) Autoradiographie
von Glykophorin A nach Gel-Filtration (exp. Teil C.5; C.6; C.7)

In der Elektrophorese konnten durch PAS-Färbung drei Banden nachgewiesen werden, wobei die größte Bande mit PAS I, die beiden kleineren mit PAS II bezeichnet wurden. Dieses Ergebnis stimmte mit den Beobachtungen von MUELLER (14) überein, der die Auftrennung der Bande PAS II beschrieben hatte. Durch die Autoradiographie konnte nachgewiesen werden, daß sich in allen drei Banden ^{14}C -Radioaktivität befand. Darüber hinaus wurde ^{14}C -Radioaktivität im oberen Teil des Gels nachgewiesen (Abb. 7b). Dies kann mit dem Entstehen von Quervernetzungsprodukten erklärt werden. Um die Verteilung der ^{14}C -Radioaktivität in der SDS-PA-Elektrophorese quantitativ zu bestimmen, wurde ein Gel nach dem Anfärben mit Schiff's Reagenz in drei Millimeter breite Streifen geschnitten und die ^{14}C -Radioaktivität in den einzelnen Streifen bestimmt (Abb. 8) (exp. Teil C.8).

Aufgrund der Verteilung der ^{14}C -Radioaktivität in den einzelnen Streifen des Gels konnte nachgewiesen werden, daß alle PAS-positiven Banden mit ^{14}C -HN-3 reagiert hatten und daß die höchste ^{14}C -Radioaktivität in der mit PAS I bezeichneten Bande nachzuweisen war, d.h. in der Bande, die von FURTH-MAYR (6) als die dimere Form von Glykophorin A bezeichnet wird.

^{14}C -HN-3 – Glykophorin A

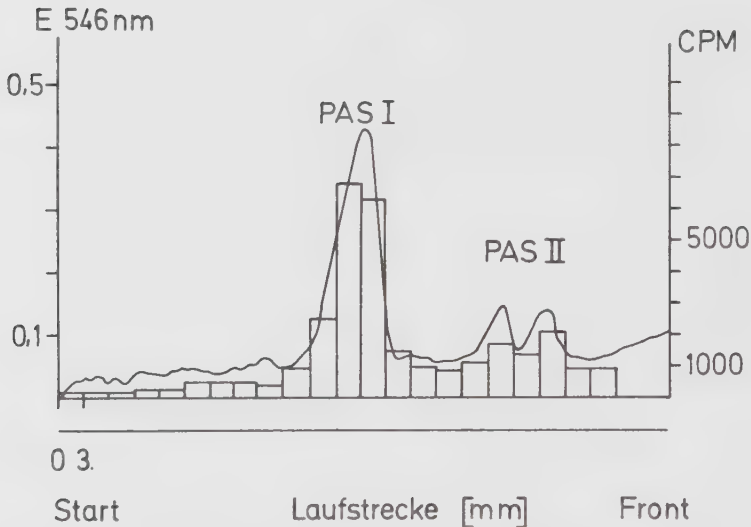


Abb. 8: Densitometrische Aufzeichnung eines SDS-PA-Gels (10 % Akrylamid) von ^{14}C -HN-3 behandeltem Glykophorin A (PAS Färbung):
 — Verteilung der Radioaktivität in den Streifen $\square$ (exp. Teil C.;; C.8)

D.5 Quantitative Bestimmung der Bindung von ^{14}C -HN-3 an Glykophorin A

Zur quantitativen Bestimmung der Bindung von ^{14}C -HN-3 an Glykophorin A wurde im isolierten Glykophorin A die ^{14}C -Radioaktivität gemessen.

153 nmol (0,765 μCi) ^{14}C -HN-3 wurden pro Milligramm Glykophorin A gebunden. Dies entspricht einem Anteil von 4 % des an die Erythrozytenmembran gebundenen ^{14}C -HN-3.

D.6 Tryptische Spaltung von isoliertem Glykophorin A
nach Inkubation der Erythrozyten mit ^{14}C -HN-3

Um zu überprüfen, welche Bezirke des Moleküls mit dem Alkylans reagiert hatten, wurde das isolierte Protein mit Trypsin gespalten (22). Trypsin spaltet Polypeptidketten bei den Aminosäuren Lysin und Arginin. Das Produkt der Proteolyse von Glykophorin A sind fünf Peptide (Abb. 9).

Das Peptid T 6 stellt den integralen Anteil von Glykophorin A dar. Wegen eines hohen Anteils an hydrophoben Aminosäuren ist es wasserunlöslich und fällt aus (17).

Reinigung dieses Peptides (exp. Teil C.10) und Bestimmung der ^{14}C -Radioaktivität erbrachten den Nachweis, daß das Peptid mit ^{14}C -HN-3 reagiert hatte.

Eine prozentuale Bestimmung der Bindung von ^{14}C -HN-3 bezogen auf die Gesamtbindung an Glykophorin A war jedoch nicht möglich, da nicht die gesamte eingesetzte Menge von Glykophorin A durch Trypsin gespalten werden und das ungespaltene Glykophorin A nicht quantitativ von den Peptiden abgetrennt werden konnte.

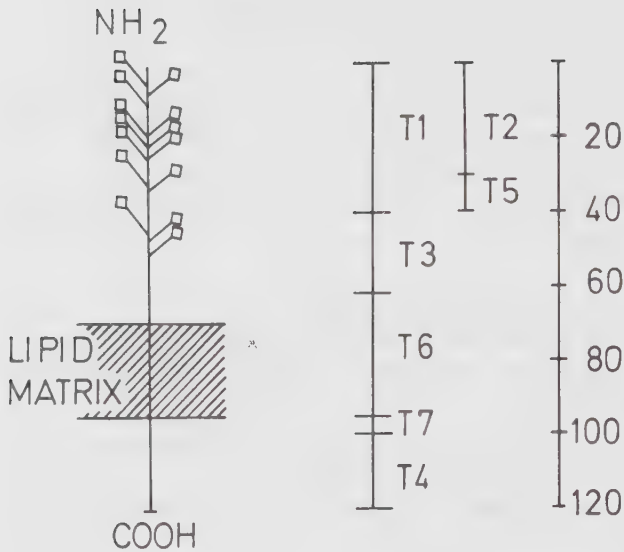


Abb. 9: Schematische Anordnung von Glykophorin A in der Erythrozytenmembran und Zuordnung der tryptischen Spaltprodukte (modifiziert nach SCHULTE (17))

- a) Zeigt die Anordnung der Kohlehydrate an der Peptidkette. Das N-terminale Ende des Moleküls befindet sich an der Zellmembranaußenseite, das C-terminale ist dem Cytosol zugewandt.
- b) Zeigt die entsprechenden tryptischen Spaltprodukte. Das Peptid T 1 kann nach Abspaltung der Kohlehydrate mit Sialidase, durch Trypsin in die Peptide T 2 und T 5 gespalten werden (22).
- c) Zeigt die Zuordnung der Aminosäuren der Peptidkette, wobei die erste Aminosäure am N-terminalen Ende die Nummer Eins erhielt.

D.7 Zweidimensionale Auftrennung und Autoradiographie
der wasserlöslichen tryptischen Spaltprodukte
von Glykophorin A

Um zu untersuchen, ob an den wasserlöslichen tryptischen Spaltprodukten ^{14}C -Radioaktivität nachzuweisen war, wurde eine zweidimensionale Auftrennung und Autoradiographie durchgeführt (exp. Teil C.11) (3). Hierbei wurden die Peptide auf einer Dünnschichtplatte zuerst durch Chromatographie und anschließend durch Elektrophorese aufgetrennt. Nach Detektion der Peptide mit Ninhydrin (Abb. 10a) erfolgte die Autoradiographie (Abb. 10b).

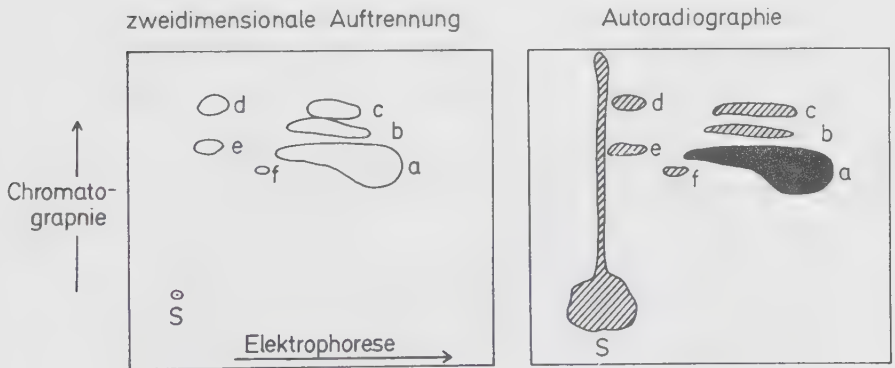


Abb. 10: Zweidimensionale Auftrennung und Autoradiographie der wasserlöslichen tryptischen Peptide von mit 2,0 mmol ^{14}C -HN-3 behandeltem Glykophorin A (3)

Abb. 10a zeigt das Ergebnis der zweidimensionalen Auftrennung nach Anfärbung der Peptide mit Ninhydrin.

Abb. 10b zeigt die entsprechende Autoradiographie.

Die mit (a) bezeichnete Fläche wies eine intensivere Schwärzung (und damit eine höhere ^{14}C -Radioaktivität) als die gestrichelten Flächen auf (exp. Teil C.11).

Die relativ geringe Spezifität der Reaktion mit ^{14}C -HN-3 zeigte sich darin, daß in allen Peptiden ^{14}C -Radioaktivität nachgewiesen werden konnte. Nur das mit (a) bezeichnete Peptid (Abb. 9b) wies einen höheren Anteil ^{14}C -Radioaktivität auf.

D.8 Reaktion von ^{14}C -HN-3 mit dem Peptid T 1 von Glykophorin A

Wie aus der Abbildung 9 hervorgeht, entsteht bei der tryptischen Spaltung von Glykophorin A ein besonders großes Abbauprodukt, das Peptid T 1, das fast den gesamten Kohlehydrat-Anteil des Proteins trägt. Da T 1 an der Außenseite der Membran herausragt, dürfte es einer Reaktion mit HN-3 besonders zugänglich sein. Ferner wird es bei einer Behandlung intakter Erythrozyten mit Trypsin abgespalten und kann daher leicht isoliert und analysiert werden.

Erythrozyten wurden mit 2,0 mmol ^{14}C -HN-3 inkubiert, zum Entfernen von überschüssigem HN-3 gewaschen und mit Trypsin inkubiert (exp. Teil C.13). Nach der Inkubation wurden die Erythrozyten abzentrifugiert und der Überstand gefrieretrocknet. Vom Überstand wurde eine SDS-PA-Gelelektrophorese durchgeführt und das Gel nach PAS-Färbung densitometrisch ausgewertet (Abb. 11). Anschließend wurde das Gel in 3 mm breite Streifen geschnitten und die ^{14}C -Radioaktivität in den einzelnen Streifen bestimmt.

Überstand tryptische Spaltung

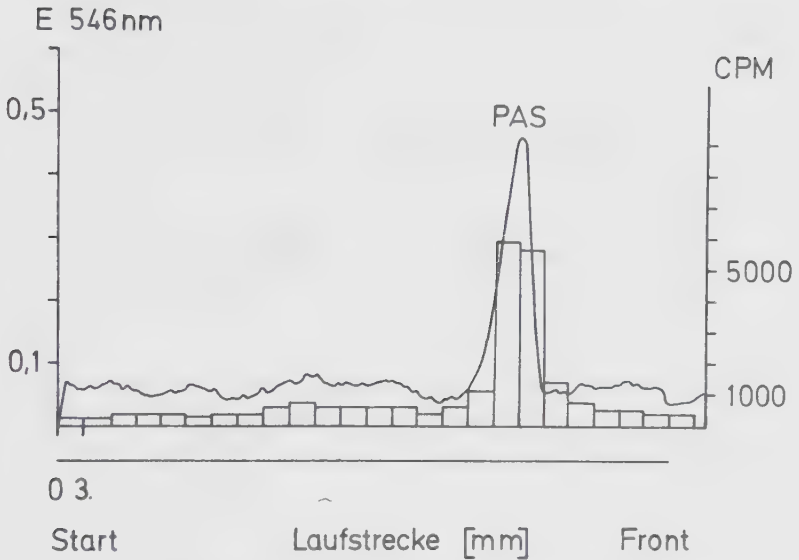


Abb. 11: SDS-PA-Gelelektrophorese vom Überstand ^{14}C -HN-3 behandelter Erythrozyten nach Inkubation mit Trypsin
 Gradientengel 10 % - 20 % Akrylamid
 PAS-Färbung mit Schiff's Reagenz
 densitometrische Auswertung bei 546 nm: ———
 Nachweis der ^{14}C -Radioaktivität: $\square$
 (exp. Teil C.6; C.8; C.13)

Abbildung 11 zeigt das Ergebnis der Abspaltung des extrazellulären Anteils von Glykophorin A durch Trypsin. Mittels SDS -PA-Gelelektrophorese ließ sich eine mit Schiff's Reagenz anfärbbare Bande (PAS) nachweisen, die ^{14}C -Radioaktivität enthielt.

Zum Vergleich wurde Glykophorin A aus nicht mit HN-3 inkubierten Erythrozyten isoliert und tryptisch gespalten. Die SDS-PA-Gelelektrophorese ergab an derselben Stelle im Gel eine mit Schiff's Reagenz anfärb-

bare Bande (Abb. 12). Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß es sich bei den mit PAS bezeichneten Banden in Abb. 11 und 12 um das Peptid T 1 von Glykophorin A handelt.

Tryptische Spaltprodukte von Glykophorin A

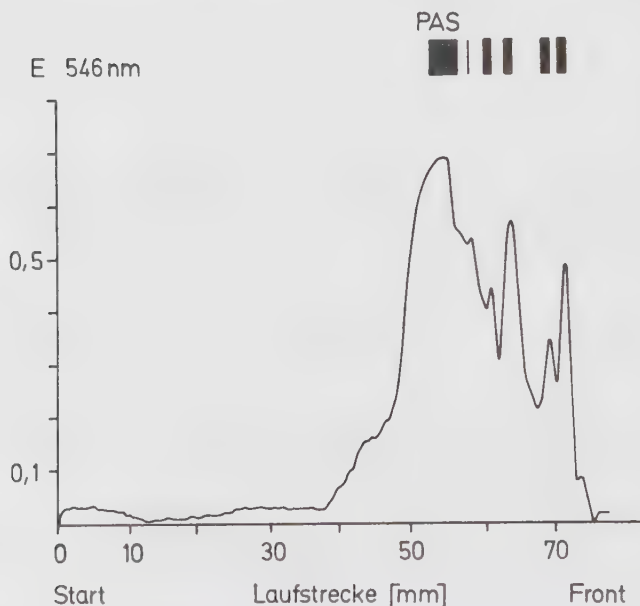


Abb. 12: Densitometrische Auswertung der SDS-PA-Gelelektrophorese mit nativem Glykophorin A nach Inkubation mit Trypsin

Gradientengel (10 % - 20 % Akrylamid)
 PAS-Färbung mit Schiff's Reagenz und anschließend
 Färbung mit Comassie-Blau (die PAS-positive Ban-
 de ist in der Abbildung gekennzeichnet).
 densitometrische Auswertung bei 546 nm: ———
 (exp. Teil C.3; C.4; C.5; C.6; C.10)

D.9 Reaktion von ^{14}C -HN-3 mit den Kohlehydraten von Glykophorin A

Da 60 % des Molekulargewichtes durch den Kohlehydratanteil von Glykophorin A bestimmt werden (11) und sich der Kohlehydrate tragende Anteil des Moleküls an der Zellaußenseite der Erythrozytenmembran befindet, sollte untersucht werden, ob die Zuckeranteile von Glykophorin A mit ^{14}C -HN-3 reagieren. Der Kohlehydratanteil kann beim intakten Erythrozyten mit Neuraminidase selektiv abgespalten (6) und damit auf Einbau von ^{14}C -Radioaktivität analysiert werden.

Erythrozyten wurden mit 2,0 mmol ^{14}C -HN-3 inkubiert. Nach dem Waschen, zum Entfernen von überschüssigem ^{14}C -HN-3, wurden sie mit Neuraminidase behandelt (exp. Teil C.12).

Nach 3 Stunden wurden die Erythrozyten abzentrifugiert und der Überstand lyophilisiert. Vom Lyophilisat wurde eine SDS-PA-Gelelektrophorese angefertigt, die mit Schiff's Reagenz angefärbt wurde (Abb. 13). Anschließend wurde das Gel in 3 mm breite Streifen geschnitten und die ^{14}C -Radioaktivität in den einzelnen Streifen bestimmt.

Abbildung 13 zeigt, daß im Überstand eine PAS-positive Bande sichtbar wurde, die auch ^{14}C -Radioaktivität enthielt, d.h.

^{14}C -HN-3 reagiert mit den Kohlehydraten von Glykophorin A.

Überstand Neuraminidase

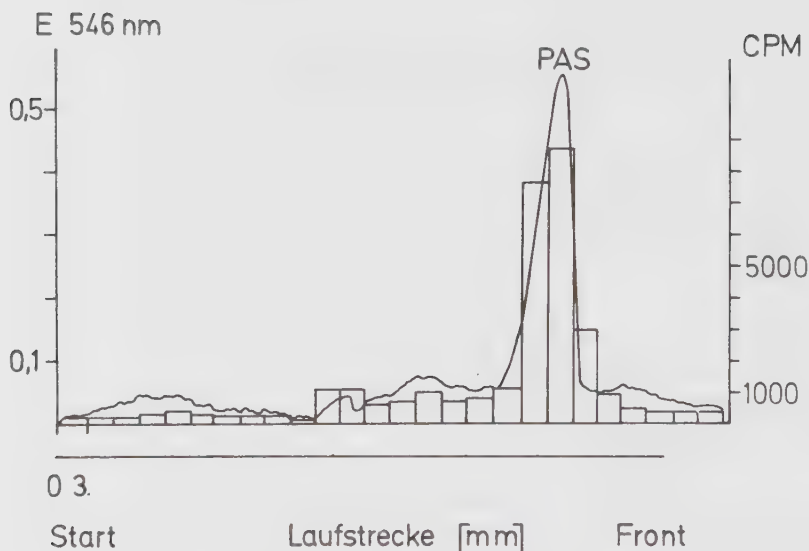


Abb. 13: Densitometrische Auswertung der SDS-PA-Gelelektrophorese vom Überstand ^{14}C -HN-3 behandelte Erythrozyten nach Inkubation mit Neuraminidase

Gradientengel (10 % - 20 % Akrylamid)

PAS-Färbung mit Schiff's Reagenz

densitometrische Auswertung bei 546 nm: ———

Nachweis der ^{14}C -Radioaktivität: ▮

(exp. Teil C.6; C.8; C.12)

D.10 Hitze-Dissoziation von Glykophorin A nach Inkubation intakter menschlicher Erythrozyten mit HN-3

Durch Verwendung der Reaktion von HN-3 mit Glykophorin A sollte der Frage nachgegangen werden, ob Glykophorin A in der monomeren oder dimeren Form in der Erythrozyten-

membran vorliegt. Die Vorstellung dabei war, daß die Untereinheiten einer möglichen dimeren Form durch HN-3 kovalent so miteinander verbunden werden können, daß sie durch das Verfahren der Hitze-Dissoziation (6) nicht mehr voneinander getrennt werden können. Dazu wurden Erythrozyten mit steigenden Konzentrationen HN-3 inkubiert (0,5 mmol; 1,0 mmol; 2,0 mmol). Zur Kontrolle dienten Erythrozyten, die nicht mit HN-3 inkubiert waren.

Nach Präparation der Membranen (exp. Teil C.1.1) und Proteinbestimmung (9) wurden die Membranen in einer Pufferlösung (FURTHMAYR (6)) bei 37 °C inkubiert (exp. Teil C.14). Nach Inkubation wurde ein Teil abgenommen und durch SDS-PA-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach Anfärben der Glykoproteine wurde die Extrinktion der einzelnen Banden densitometrisch bei 546 nm gemessen.

Abbildung 14 und 15 zeigen das Verhalten von Glykophorin A von unbehandelten Erythrozyten. Nach dem Erhitzen der isolierten Membranen auf 100 °C (Abb. 15) nimmt die PAS II Bande deutlich zu.

Nach FURTHMAYR (6) handelt es sich hierbei um die Aufspaltung der dimeren Form in Monomere.

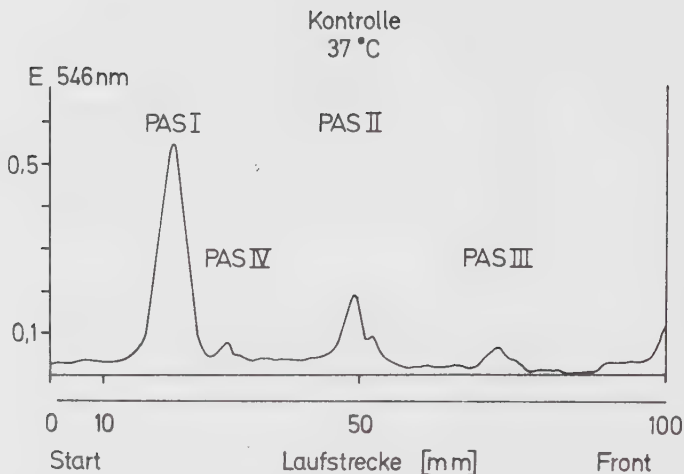


Abb. 14: Densitometrische Auswertung der SDS-PA-Gelelektrophorese von unbehandelten Erythrozyten Inkubation bei 37 °C

Nach der Isolierung der Erythrozytenmembranen wurden diese in einer Pufferlösung (FURTHMAYR (6)) bei einer Konzentration von 3 % SDS 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Nach der SDS-PA-Gelelektrophorese (10 % Akrylamid) und Anfärbung der Glykoproteine mit Schiff's Reagenz wurde die Intensität der einzelnen Banden densitometrisch bei 546 nm gemessen (exp. Teil C.14).

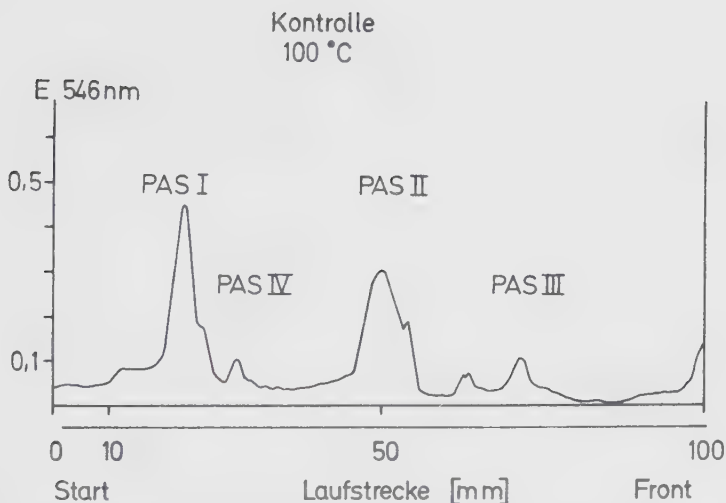


Abb. 15: Densitometrische Auswertung der SDS-PA-Gelelektrophorese von unbehandelten Erythrozyten, Inkubation bei 100 °C

Von den bei 37 °C inkubierten Erythrozyten (Abb. 14) wurde ein Aliquot abgenommen und drei Minuten auf 100 °C erhitzt.

Nach der SDS-PA-Gelelektrophorese (10 % Akrylamid) und Anfärbung der Glykoproteine mit Schiff's Reagenz wurde die Intensität der einzelnen Banden densitometrisch bei 546 nm gemessen (exp. Teil C.14).

Abbildung 16 und 17 zeigen das elektrophoretische Verhalten der Glykoproteine von Erythrozyten, die mit 2,0 mmol HN-3 behandelt waren. (Bei dieser Konzentration hatten WILDENAUER und WEGER (25) die vollständige Polymerisation des Membranstrukturproteins Spektrin beobachtet.)

Vor dem Erhitzen auf 100 °C bei einer Konzentration von 3 % SDS überwiegt die PAS I Bande (Abb. 16).

Nach dem Erhitzen auf 100 °C kommt es zu einer deutlichen Zunahme der PAS II Bande (Abb. 17).

Weiterhin erscheint sowohl vor als auch nach der Hitze-Dissoziation eine diffus in das Sammelgel hineinreichende Zone, die in den Abbildungen mit "P" bezeichnet wurde. Diese Zone war ebenfalls mit Schiff's Reagenz anfärbbar.

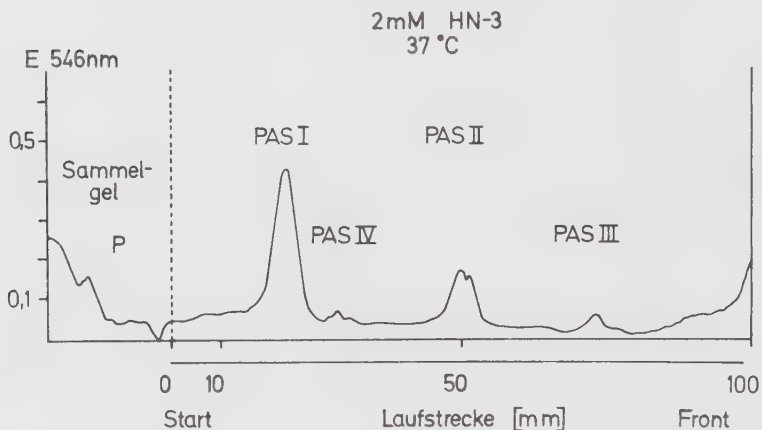


Abb. 16: Densitometrische Auswertung der SDS-PA-Gelelektrophorese von Erythrozyten, die mit 2,0 mmol HN-3 inkubiert waren, Inkubation bei 37 °C

Nach Inkubation der Erythrozyten und Isolierung der Erythrozytenmembranen wurden diese in einer Pufferlösung (FURTHMAYR (6)) bei einer Konzentration von 3 % SDS 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der SDS-PA-Gelelektrophorese (10 % Akrylamid) und Anfärbung der Glykoproteine mit Schiff's Reagenz wurde die Intensität der einzelnen Banden densitometrisch bei 546 nm gemessen (exp. Teil C.14).

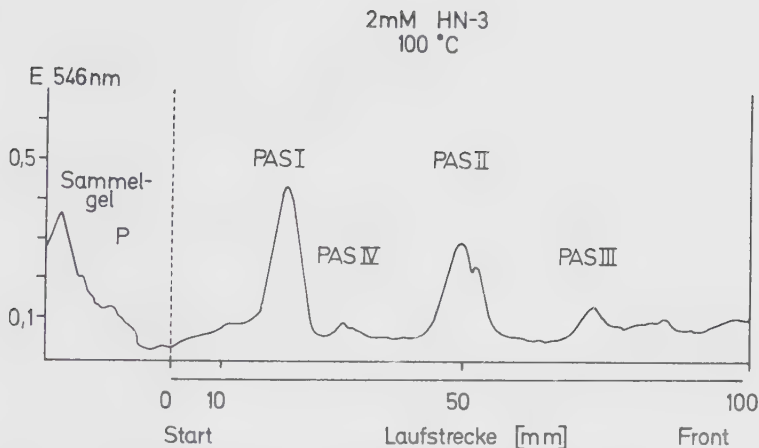


Abb. 17: Densitometrische Auswertung der SDS-PA-Gelelektrophorese von Erythrozyten, die mit 2,0 mmol HN-3 inkubiert waren, Inkubation bei 100 °C

Von den 37 °C inkubierten Erythrozyten (Abb. 16) wurde ein Aliquot abgenommen und drei Minuten auf 100 °C erhitzt. (Abb. 17).

Nach der SDS-PA-Gelelektrophorese (10 % Akrylamid) und Anfärbung der Glykoproteine mit Schiff's Reagenz wurde die Intensität der einzelnen Banden densitometrisch bei 546 nm gemessen (exp. Teil C.14).

Um die Veränderungen der PAS-positiven Banden in der SDS-PA-Gelelektrophorese bei den verschiedenen HN-3-Konzentrationen quantitativ vor und nach Hitze-Dissoziation zu erfassen, wurden die Flächen unter den einzelnen Peaks der densitometrisch aufgezeichneten Spektren durch Integration bestimmt.

Bei der Auswertung zeigte sich, daß die Banden PAS III und PAS IV durch die Behandlung der Erythrozyten mit HN-3 keine signifikante Veränderung erfuhren. Da-

her wurden diese Banden aus der weiteren Berechnung herausgenommen.

Sowohl bei der Kontrolle als auch bei allen verwendeten HN-3 Konzentrationen überwog nach Inkubation bei 37 °C und 3 % SDS die PAS I Bande (Abb. 18).

Nach dem Erhitzen der Proben auf 100 °C änderte sich das Verhältnis von PAS I zu PAS II zugunsten der Bande PAS II sowohl bei der Kontrolle als auch bei allen verwendeten HN-3 Konzentrationen, d.h. durch die Hitze-Dissoziation wird die dimere Form von Glykophorin A in die Monomeren aufgespalten (nach FURTHMAYR (14)) (Abb. 19).

Weiterhin trat bei allen HN-3 Konzentrationen sowohl vor als auch nach Hitze-Dissoziation an der Auftragsstelle der Gele eine mit "P" bezeichnete PAS-positive Bande auf, die diffus in das Gel hinein reichte und deren prozentualer Anteil mit zunehmender HN-3 Konzentration zunahm.

- a) Die Hitze-Dissoziation von Glykophorin A von mit HN-3 behandelten Erythrozyten ist möglich. Durch Erhitzen der Proben auf 100 °C mit 3 % SDS wird das Verhältnis von PAS I zu PAS II zugunsten von PAS II verschoben.

Das bedeutet, daß es entweder mit dieser Versuchsanordnung nicht gelang, die Untereinheiten einer möglichen dimeren Form durch HN-3 kovalent miteinander zu verbinden oder aber, Glykophorin A liegt in der Erythrozytenmembran nicht in der dimeren Form vor.

- b) Glykophorin A wird durch HN-3 an andere Proteine (der Membran) gebunden. Dies läßt sich aus dem Auftreten der mit "P" bezeichneten hochmolekularen Polymerisationsprodukte schließen. Diese Polymerisationsprodukte wandern als diffuse Zone in das Sammelgel und können mit Schiff's Reagenz angefärbt werden.

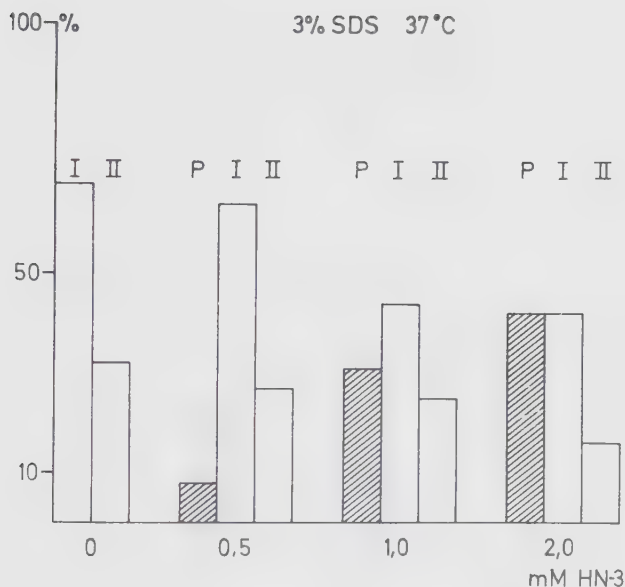


Abb. 18: Prozentuale Verteilung der Banden PAS I, PAS II und "P" vor Durchführung der Hitze-Dissoziation

Erythrozyten wurden mit 0,5 mmol, 1,0 mmol und 2,0 mmol HN-3 30 Minuten in einer Pufferlösung (FURTHMAYR (6)) inkubiert. Nach der SDS-PA-Gelelektrophorese (10 % Akrylamid) und Anfärbung der Glykoproteine mit Schiff's Reagenz wurde die Intensität der einzelnen Banden densitometrisch bei 546 nm gemessen. Die Flächen unter den einzelnen Peaks wurden durch Integration ermittelt. I = PAS I; II = PAS II; P = diffuse Zone im Sammelgel. Die Summe der Flächen von PAS I, PAS II und P entspricht 100 %.

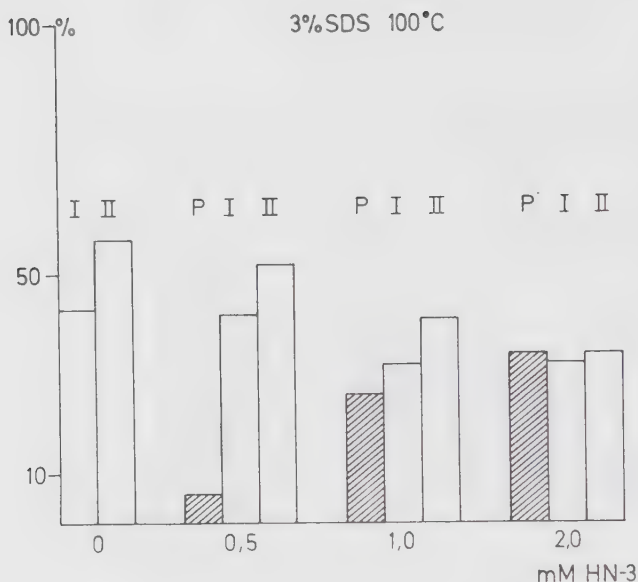


Abb. 19: Prozentuale Verteilung der Banden PAS I, PAS II und "P" nach Durchführung der Hitze-Dissoziation

Von den bei 37 °C inkubierten Erythrozyten (Abb. 18) wurde ein Aliquot abgenommen und 3 Minuten bei 100 °C inkubiert. Nach der SDS-PA-Gelelektrophorese (10 % Akrylamid) und Anfärbung der Glykoproteine mit Schiff's Reagenz wurde die Intensität der einzelnen Banden densitometrisch bei 546 nm bestimmt. Die Flächen unter den einzelnen Peaks wurden durch Integration ermittelt. Die Summe der Flächen von PAS I, PAS II und P entspricht 100 %.

Zusammenfassung

- a) Nach Inkubation intakter menschlicher Erythrozyten mit ^{14}C -HN-3 ließ sich aus der Erythrozytenmembran ein Glykoprotein isolieren, das radioaktiv markiert war, und sich in der SDS-PA-Gelelektrophorese wie Glykophorin A verhielt (Ergebnisse D.2 - D.5).
- b) Die Spaltung von isoliertem Glykophorin A nach Inkubation der Erythrozyten mit ^{14}C -HN-3 ergab, daß sowohl der dem Cytosol zugewandte Teil als auch der integrale Anteil sowie der Teil von Glykophorin A, der sich an der Außenseite der Zellmembran befindet, mit ^{14}C -HN-3 reagiert hatte (Ergebnisse D.6 - D.7).
- c) Von der Zellmembranaußenseite intakter Erythrozyten, die mit ^{14}C -HN-3 inkubiert waren, ließ sich mit Trypsin ein Peptid abspalten, das radioaktiv markiert war und sich mit Schiff's Reagenz anfärben ließ. Durch den Vergleich mit den tryptischen Spaltprodukten von nativem Glykophorin A konnte vermutet werden, daß es sich hierbei um das Peptid T 1 handelt (Ergebnisse D.8).
- d) Von der Zellmembranaußenseite intakter Erythrozyten, die mit ^{14}C -HN-3 inkubiert waren, ließen sich Kohlehydrate durch Neuraminidase abspalten, die radioaktiv markiert waren (Ergebnisse D.9).
- e) Nach der Reaktion von Erythrozyten mit HN-3 ist selbst bei der am höchsten verwendeten Konzentration von 2,0 mmol HN-3 die von FURTHMAYR (6) beschriebene Hitze-Dissoziation möglich (Ergebnisse D.10).

- f) Bei der Reaktion von HN-3 mit der Erythrozytenmembran entstehen hochmolekulare Polymerisationsprodukte, die mit Schiff's Reagenz anfärbbar sind. (Ergebnisse D.10)

E. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob das Alkylans Tris(2-chloräthyl)amin (HN-3) mit dem integralen Glykoprotein-, Glykophorin A- der menschlichen Erythrozytenmembran reagiert. Dazu wurde das Protein, nach Inkubation intakter Erythrozyten mit ^{14}C -HN-3, aus der Membran isoliert.

Durch die Bestimmung der ^{14}C -Radioaktivität konnte nachgewiesen werden, daß 4 % des an die Membran gebundenen HN-3 mit Glykophorin A reagiert hatte.

Mit proteinchemischen Methoden (tryptische Spaltung, zweidimensionale Auftrennung und Autoradiographie der wasserlöslichen Spaltprodukte, Bestimmung der ^{14}C -Radioaktivität am wasserunlöslichen integralen Anteil) konnte am isolierten Glykophorin A nachgewiesen werden, daß alle Bereiche der Peptidkette mit ^{14}C -HN-3 reagiert hatten.

Nach Inkubation intakter Erythrozyten mit ^{14}C -HN-3 wurden die Kohlehydrate mit Neuraminidase von der Oberfläche der Erythrozytenmembran abgespalten, und die ^{14}C -Radioaktivität bestimmt. Dabei wurde festgestellt, daß die Kohlehydrate mit ^{14}C -HN-3 reagiert hatten.

Nachdem nachgewiesen werden konnte, daß es am Glykophorin A Molekül für HN-3 keine spezifischen Bindungsstellen gibt, wurde im zweiten Teil der Arbeit untersucht, ob sich durch die Reaktion des Alkylans mit dem Glykoprotein eine Aussage über die Anordnung von Glykophorin A in der Erythrozytenmembran machen läßt, um festzustellen, ob Glykophorin A in

einer dimeren (FURTHMAYR (6)) oder monomeren Form in der Membran vorliegt.

Es wurde untersucht, ob durch die Verwendung des quervernetzenden Alkylans die Untereinheiten einer möglichen dimeren Form kovalent so miteinander verbunden werden können, daß eine Aufspaltung in Monomere durch das Verfahren der Hitze-Dissoziation nicht mehr möglich ist.

FURTHMAYR (6) ging in seinem Modell davon aus, daß Glykophorin A in der menschlichen Erythrozytenmembran als dimerer Komplex vorliegt, der sich durch Hitze-Dissoziation (3 % SDS, Erhitzen der Proben auf 100 °C) in Monomere aufspalten läßt. Diese Monomeren sind unter diesen Bedingungen in der SDS-PA-Gelelektrophorese als Bande PAS II nachweisbar. Stabilisiert wird der dimere Komplex über den integralen Anteil von Glykophorin A.

In der vorliegenden Arbeit wurden intakte Erythrozyten mit 0,5 mmol; 1,0 mmol; 2,0 mmol HN-3 inkubiert (WILDENAUER und WEGER (25) hatten bei 2,0 mmol HN-3 die vollständige Polymerisation des Membranstrukturproteins "Spektrin" beobachtet.)

Bei allen verwendeten Konzentrationen wurde nach Hitze-Dissoziation das Auftreten der Bande PAS II beobachtet. Die Bande PAS II hätte nach der Hitze-Dissoziation nicht mehr auftreten dürfen, wenn es gelungen wäre, die Untereinheiten einer möglichen dimeren Form durch das Alkylan kovalent miteinander zu verbinden.

Das Auftreten der Bande PAS II nach Inkubation der Erythrozyten mit HN-3 und anschließender Hitze-Dissoziation könnte damit erklärt werden, daß die sterische Anordnung der Untereinheiten von Glykophorin A

eine kovalente Verbindung verhindert.

Diese Vorstellung ist unwahrscheinlich, da nach der Modellvorstellung von FURTHMAYR (6) - Abb. 3 - der dimere Komplex durch den integralen Teil der Moleküle stabilisiert wird und in diesem Bereich die Moleküle sehr stark einander angenähert sind. Der integrale Teil ist aber identisch mit dem Peptid T 6 der tryptischen Spaltung. In diesem Peptid konnte die Reaktion mit ^{14}C -HN-3 nachgewiesen werden, so daß eine kovalente Verbindung zweier Monomeren in diesem Bereich möglich gewesen wäre.

Weiterhin spricht gegen eine dimere Anordnung das Auftreten der mit "P" bezeichneten PAS-positiven Zone in der SDS-PA-Gelelektrophorese, denn damit konnte nachgewiesen werden, daß Glykophorin A durch HN-3 an Membranproteine gebunden werden kann.

Als möglicher Reaktionspartner käme, neben anderen, das Membranprotein Spektrin in Frage, das durch die Reaktion mit HN-3 zu hochmolekularen Polymerisationsprodukten verbunden wird (24).

Nach den vorliegenden Ergebnissen liegt Glykophorin A nicht als dimerer Komplex in der Erythrozytenmembran vor.

F. Geräte und Materialien

F.1 Geräte

Hersteller

Gel-Chromatographie:

Univord II

LKB

Colora Schreiber

Colora Meßtechnik

Fraktionssammler

Ultrarac II

LKB

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Gelapparatur nach Studier (L)

Power supply 2105

LKB

Szintillationszähler

TRI-CARB Modell 3380

Packard

Zentrifugen

Ultrazentrifuge L3-50

Beckmann

MSE High Speed 18

Sputnik

Heraeus Christ

Laborfuge

Christ

Microfuge

Beckmann

Gefriertrockner

Delta I/IA

Christ

Photometer

Zeiss-Spektralphotometer PMQ 3

Zeiss

Zeiss-Chromatogramm-Spektralphotometer mit achromatischer Optik

G 50 - 657/K/II - d

Zeiss

Schreiber linear mit Integrator
Servogor S

Metrawatt

Dünnschichtchromatographie

TLC Platten Polygram

Macherey Nagel

Dünnschicht-Elektrophorese Gerät Delsolga

Mikroskop

Lichtmikroskop mit Phasen-Inter-
ferrenzkontrast nach Normarksy Zeiss

F.2 Material

Enzyme

Trypsin Sigma
Neuraminidase Sigma
Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen Sigma

Chromatographiezubehör

Phosphocellulose P 11 Serva
Biogel A 0,5 (mesh 400) Bio-Rad
Natriumdodecylsulfat (SDS) Bio-Rad

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS Bio-Rad
Polyacrylamid Serva
TEMED Serva
Bis-methylenacrylamid Serva
Ammoniumpersulfat Serva

Soluene Packard
Instagel Packard
Protosol NEN-Chemicals
Econofluor NEN-Chemicals

Radioaktive Substanzen

(U¹⁴C)Tris(2-chloräthyl)amin-Hy- synthetisiert von
drochlörd (HN-3) (spez. Aktivität Behringwerken
5 mCi/mMol)

HN-3 EGA-Chemie

Alle anderen Reagenzien (p.A.) wurden von der Firma Merck
bezogen.

Literaturverzeichnis

- (1) BRANTON, D., COHEN, C.M., TYLER, J.:
Interaction of cytoskeletal proteins of the human
erythrocyte membrane
Cell 24, 24 (1981)
- (2) BRETSCHER, M.S., RAFF, M.C.:
Mammalian plasma membranes.
Nature 258, 43, (1975)
- (3) CHEN, R.:
The sequence determination of a protein in a micro
scale. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 873
(1976)
- (4) FURTHMAYR, H.:
Glycophorins A, B and C.: A family of sialoglycopro-
teins. Isolation and characterization of Trypsin
derived peptides.
Journ. Supramol. Struct. 9 195 (1978)
- (5) FURTHMAYR, H.:
Structural comparison of glycophorins and immuno-
chemical analysis of genetic variants.
Nature 271, 519 (1978)
- (6) FURTHMAYR, H.:
Subunit structure of human erythrocyte glykophorin A.
Biochemistry 15, 1137 (1976)
- (7) FURTHMAYR, H., MARCHESI .V.t., TOMITA, M.:
Fractionation of the major sialoglycopetides of the
human red blood cell membrane.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 65, 113 (1975)

- (8) LAEMMLI, U.K.:
Cleavage of structural proteins during the assembly
of the head of bacteriophage T 4.
Nature 227, 680 (1970)
- (9) LOWRY, P.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL,
R.J.:
Protein measurement with the Folin phenol reagent
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
- (10) MARCHESI, V.T.:
Functional proteins of the human red blood cell
membrane. In: MADDY, A.H.: Seminars in Hematology,
16, 3 (1979)
- (11) MARCHESI, V.T., ANDREWS, E.P.:
Glycoproteins: Isolation from cell membranes with
Lithium Diiodosalicylate, Sci 174, 1247 (1971)
- (12) MARCHESI, V.T., FURTHMAYR, M., TOMITA, H.:
The red cell membrane,
Annu. Rev. Biochem. 45, 667 (1976)
- (13) MORTON, L.S.G., GARVIN, J.E.:
Subunit structure of the human erythrocyte glyco-
protein: Depolymerization by heating ghosts with
sodium dodecyl sulfate. Biochem. Biophys. Res.
Comm. 52, 1457 (1973)
- (14) MUELLER, T.J., DOW, A.W., MORRISON, M.:
Heterogeneity of sialoglycoproteins of the normal
human erythrocyte membrane
Biochem. Biophys. Res. Comm. 72, 94 (1976)
- (15) REICHSTEIN, E., BLOSTEIN, R.:
Arrangement of human erythrocyte membrane proteins.
J. Biol. Chem. 250, 6256 (1975)

- (16) REUTHER, H.:
Erythrozyten als Modell für Wechselwirkungen von
Pharmaka mit biologischen Membranen.
Dissertation Ludwig Maximilians Universität München
(1982)
- (17) SCHULTE, T.H., MARCHESI, V.T.:
Conformation of human erythrocyte Glycophorin A
and its constituent peptides.
Biochem. 18, 275 (1979)
- (18) SINGER S.J., NICHOLSON, G.L.:
The fluid mosaic model of the structure of cell
membranes.
Science 175, 720 (1972)
- (19) SPRINGER, G.F., NAGAI, Y., TEGTMEYER, H.:
Isolation and properties of human blood-group NN
and meconium Antigens
Biochem. 5, 3254 (1966)
- (20) STECK, T.L.:
Cross-linking of the major proteins of the isolated
erythrocyte membrane
J. Mol. Biol. 66, 295 (1974)
- (21) STUDIER, F.W.:
Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and Pro-
teins on slab gels.
J. Molec. Biol. 79, 237 (1973)
- (22) TOMITA, M., FURTHMAYR, H., MARCHESI, V.T.:
Primary structure of human erythrocyte Glycopho-
rin A. Isolation and characterization of peptides and
complete amino acid sequence.
Biochem. 17, 4756 (1978)

- (23) WINZLER, R.J.:
A glycoprotein in human erythrocyte membranes.
In: JAMIESON, G.A., GREENWALT, T.J. (eds.): Red
cell membrane. Structure and Function.
Lippincott, 157 (1969)
- (24) WILDENAUER, D B., REUTHER, H., REMIEN, J.:
Reactions of the alkylating agent tris(2-chloroethyl)-
amine with the erythrocyte membrane.
Biochem. Biophys. Acta 603, 101 (1980)
- (25) WILDENAUER, D.B., WEGER, N.:
Reactions of the trifunctional nitrogen mustard
tris(2-chloroethyl)-amine (HN 3) with human ery-
throcyte membranes in vitro.
Biochem. Pharmacol. 28, 2761 (1979)
- (26) ZACHARIUS, ZELL, MORRISON, WOODLOCK:
Glycoprotein staining following electrophoresis
on acrylamid gels
Anal. Biochem. 30, 148 (1969)

Die vorliegende Arbeit wurde von 1980 bis 1983 am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität München durchgeführt.

Danken möchte ich Herrn Prof. W. Forth and Herrn Dr. rer. nat. D. Wildenauer für die Überlassung des Themas und die Betreuung.

Herrn Dr. rer. nat. H. Reuther danke ich für die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen.

Martin Schorsch

Lebenslauf

Geboren: 09.01.1950 in Bor Jugoslawien

Eltern: Klara und Peter Schorsch

Schulbesuch: 1956-1961 Grundschule Aachen/Kaiserstraße
1961-1968 Couven-Gymnasium Aachen
1968-1971 Chemielaboranten-Ausbildung
an der RWTH Aachen
1971 Reifeprüfung am Ernst-Moritz-
Arndt-Gymnasium Bonn

Studium: 1971-1972 Chemiestudium an der RWTH
Aachen
1974-1976 Chemiestudium an der TU München
1976-1983 Medizinstudium an der Univer-
sität München
Approbation Mai 1983

Wehrdienst: 1972-1974

